

# Стан імунної та ендокринної систем у мишей із різним гаплотипом H-2 та його потенційний зв'язок із проявами експериментального паркінсонізму

І.Ф. Лабунець, А.Є. Родніченко

*Інститут генетичної та регенеративної медицини ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені М.Д.Стражеска Національної академії медичних наук України», Київ; e-mail: irina\_labunets@ukr.net*

*У мишей-самців лінії FVB/N (гаплотип H-2q) і 129/Sv (гаплотип H-2b) віком 6-7 міс оцінювали показники функціонування тимуса, кісткового мозку, селезінки, епіфіза і надниркових залоз, кількість клітин CD3<sup>+</sup> (Т-лімфоцити) і CD11b<sup>+</sup> (макрофаги) у головному мозку, а також вивчали особливості змін показників після введення таким мишам нейротоксину 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФТП); відтворення моделі паркінсонізму. Показано, що у інтактних мишей лінії FVB/N вміст тимуліну в крові, маса і клітинність тимуса менша, а кількість CD3<sup>+</sup>-клітин, колонієутворювальних клітин-попередників для фібробластів і гранулоцитів-макрофагів у кістковому мозку більша, ніж у мишей лінії 129/Sv. Кількість CD3<sup>+</sup>- і CD11b<sup>+</sup>-клітин у головному мозку мишей лінії FVB/N перевищує їхні значення у мишей лінії 129/Sv у 1,6 і 2,2 раза відповідно. Вміст мелатоніну в крові мишей лінії FVB/N менший в 2,4 раза, тоді як маса надниркових залоз більша. У дослідях *in vitro* встановлено зменшення вмісту тимуліну в супернатанті культивованої стромы тимусів після інкубації з кортикостероном у мишей лінії 129/Sv (з  $5,8 \pm 0,6$  до  $3,8 \pm 0,4 \log_2$ ) і відсутність змін показника у мишей лінії FVB/N. Через 18 діб після введення МФТП зменшилася вміст у крові тимуліну, маса та клітинність селезінки у мишей лінії 129/Sv, зменшилася маса і клітинність тимуса у мишей обох ліній, а також збільшилася маса надниркових залоз у мишей лінії FVB/N. Під впливом нейротоксину в головному мозку останніх частка CD3<sup>+</sup>-клітин стала більше, ніж у групі контролю, тоді як у мишей лінії 129/Sv зростала частка CD11b<sup>+</sup>-клітин. Таким чином, гаплотип H-2 мишей впливає на функціонування центральних і периферичних органів імунної та ендокринної систем, кількість Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку, а також особливості змін показників після введення МФТП, що може мати значення для формування особливостей морфофункціональних порушень нервової системи у таких тварин.*

*Ключові слова: експериментальний паркінсонізм; нейротоксин МФТП; гаплотип; тимус; тимулін; кістковий мозок; мелатонін; Т-лімфоцити і макрофаги головного мозку.*

## ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – одне із найбільш розповсюджених хронічних прогресуючих нейродегенеративних захворювань [1]. Існує зв'язок між схильністю до розвитку цієї патології та поліморфізмом як генів специфічних, асоційованих із мітохондріальною дисфункцією і антиоксидантним захистом, так і генів головного комплексу гістосумісності (HLA) [1, 2]. При цьому показано, що поліморфізм останніх асоційований з особливостями

функціонування імунної (утворення прозапального цитокіну -туморнекротичного фактора  $\alpha$ , імуноглобулінів, Т-клітин/хелперів, моноцитів) та гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної систем; значення дисфункції цих систем для патогенезу ХП/паркінсонізму доведено [2–4]. Водночас зв'язок особливостей функціонування внутрішньосистемних регуляторів згаданих систем (тимус, кістковий мозок, епіфіз) із поліморфізмом генів головного комплексу гістосумісності та

розвитком паркінсонізму залишається недостатньо вивченим.

Дослідження впливу поліморфізму генів HLA на розвиток нейродегенеративної патології за участі імунних та ендокринних чинників неможливе без використання адекватних експериментальних моделей. Одним із перспективних об'єктів для подібних досліджень є миші інбредних ліній, які відрізняються за гаплотипом H-2 (аналог системи HLA людини) [5]. Зокрема, було показано, що миші лінії FVB/N (гаплотип H-2q) і 129/Sv (гаплотип H-2b) мають відмінності у функціонуванні центральної нервової системи (ЦНС), периферичної ланки імунної системи, надниркових залоз, чутливості до дії деяких ушкоджуючих чинників, ефективності моделювання паркінсонізму [6–8].

Мета нашої роботи – виявити у мишей із різним гаплотипом H-2 відмінності у функціонуванні центральних і периферичних органів імунної та ендокринної систем, а також визначити особливості змін цих систем за умов нейротоксиніндукованого паркінсонізму.

## МЕТОДИКА

*Тварини.* Досліди проводили на дорослих (6-7 міс) мишах-самцях лінії FVB/N (гаплотип H-2q, n = 53) і 129/Sv (гаплотип H-2b, n = 53) із розплідника Інституту генетичної та регенеративної медицини ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М.Д. Стражеска НАМН України». Тварини знаходилися у стандартних умовах віварію при фіксованому світловому режимі 12:12 та вільному доступі до їжі та води *ad libitum*.

Біологічний матеріал для дослідів отримували після декапітації мишей під ефірним наркозом у ранкові години доби (9.00–10.00). Усі експериментальні роботи виконували з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого повод-

ження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986) та з погодження з етичною комісією Інституту генетичної та регенеративної медицини Центру (протокол № 02/02-24 від 19.02.24).

*Дизайн експерименту.* Експеримент 1. Вивчення стану імунної та нейроендокринної систем у інтактних мишей лінії FVB/N (n = 34) і 129/Sv (n = 34). Експеримент 2. Для дослідження впливу нейротоксину на стан імунної та ендокринної систем дослідним групам мишей лінії FVB/N (n = 10) і 129/Sv (n = 10) одноразово, підшкірно, у дозі 30 мг/кг вводили 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (МФТП, “Sigma”, США). Показано, що нейротоксин МФТП у такій дозі через 17-18 діб після введення відтворює у мишей прояви паркінсонізму [5, 7]. Контрольні групи мишей лінії FVB/N (n = 9) і 129/Sv (n = 9) отримали одну ін'єкцію розчинника МФТП (0,9 %-й розчин хлориду натрію). Дослідження в експериментальних групах мишей проводили через 18 діб після ін'єкції нейротоксину або розчинника.

*Маса органів і вміст у них клітин.* У мишей вимірювали масу тимуса, селезінки і надниркової залози (у міліграмах). За відношенням значень маси тимуса і селезінки (у міліграмах) до маси тіла (у грамах) розраховували тимусний та селезінковий індекси відповідно (міліграми/грами · 10<sup>-3</sup>). Кількість ядровмісних клітин в тимусі, селезінці та кістковому мозку із стегнової кістки підраховували в камері Горяєва загальноприйнятим методом.

*Функціональний стан кісткового мозку* оцінювали за кількістю колонієутворювальних клітин-попередників для фібробластів (КУК-Ф) і гранулоцитів-макрофагів (КУК-ГМ). Кількість КУК-Ф визначали методом культивування клітин кісткового мозку в моношарових культурах [9]. Клітини кісткового мозку (2 · 10<sup>5</sup>) культивували в живильному середовищі, яке включало 85% RPMI-1640, 15%

ембріональної телячої сироватки, 2 ммоль/л L-глутаміну (“Sigma”, США), протягом 12 діб при 37°C у зволоженій атмосфері з вмістом 5% CO<sub>2</sub>. Кількість КУК-ГМ визначали в напіврідких агарових культурах [10]. Клітини кісткового мозку (3·10<sup>5</sup>) культивували в живильному середовищі McCoу з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки, 1,6% пірувату натрію, 10 ммоль/л L-глутаміну, 20 ммоль/л NEPEs, 0,94% бікарбонату натрію та 1% гранулоцитмакрофагального колонієстимулювального фактора (“Sigma”, США) впродовж 9 діб при 37°C у зволоженій атмосфері з наявністю 5% CO<sub>2</sub>.

Відповідно на 12-ту та 9-ту добу культивування під біокулярним мікроскопом підраховували кількість колоній, які містять не менше ніж 50 клітин. Результат наводили у вигляді кількості колоній на 1·10<sup>6</sup> клітин кісткового мозку (відносний вміст) і на загальну кількість ядровмісних клітин кісткового мозку стегнової кістки (абсолютний вміст).

При імунофенотипуванні клітин із різних органів (тимус, селезінка, кістковий і головний мозок) використовували моноклональні антитіла (МАТ), кон'юговані з флюорохромами (“BD Biosciences”, США): CD3–PE-кон'юговані антитіла (кат. № 555275), CD4–APC-CyTM 7-кон'юговані антитіла (кат. № 552051), CD8–APC-кон'юговані антитіла (кат. №. 553035) і CD11b (Mac-1) –FITC-кон'юговані антитіла (кат. № 557396). Клітини лімфоїдних органів (1·10<sup>6</sup>) або гомогенату головного мозку (1·10<sup>6</sup>) інкубували з відповідними МАТ (у 0,5 мг/мл) протягом 20 хв при температурі 4°C, відмивали у буфері *CellWash* і після цього центрифугували при 200g протягом 5 хв при 4°C. Безпосередньо перед аналізом суспензію клітин пропускали через клітинні фільтри з діаметром пор 70 мкм. Контрольні зразки клітин були без МАТ. Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (“Becton Dickinson”, США) за допомогою програми BD FACS Diva 6.1.

Ендокринну функцію тимуса оцінювали за вмістом у сироватці крові високоактивного гормону тимуліну/тимічного сироваткового фактора, як описано раніше [11, 12]. Метод визначення вмісту в сироватці крові тимуліну ґрунтується на його здатності відновлювати чутливість розеткоутворювальних клітин (РУК) селезінки мишей після тимектомії до інгібувальної дії азатіоприну (“Sigma-Aldrich”, США). Вмістом тимуліну у сироватці крові вважали її останнє розведення, при якому зменшувалася кількість РУК селезінки на 50% відносно контролю (клітини без сироватки). Результати наводили у вигляді log<sub>2</sub> титру гормону.

Функціональний стан епіфіза оцінювали за концентрацією мелатоніну в периферичній крові радіоімунним методом за допомогою стандартних наборів «Melatonin-125» фірми “Biosource” (Бельгія). Перед дослідженням сироватку тварин зберігали при –20°C впродовж 2 міс.

Для дослідження взаємодії тимуса з глюкокортикоїдами строму, виділену з тимусів мишей кожної лінії, інкубували впродовж 3 год при 37°C за наявності 50 нг/мл кортикостерону (дослід); контроль – середовище 199 без кортикостерону. Вміст тимуліну визначали в контрольних і дослідних супернатантах культивованої стромы тимусів.

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента. Різницю між показниками експериментальних груп вважали вірогідною при значенні P < 0,05. Для статистичної обробки отриманих результатів використовували програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Результати представляли у вигляді середньоарифметичного та похибки середнього (M ± m).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Функціональний стан імунної та ендокринної системи у інтактних мишей із різним гаплотипом H-2. Встановлено, що вміст тимуліну в крові мишей лінії FVB/N менший,

ніж у тварин лінії 129/Sv (табл. 1). Маса тимуса і кількість у ньому ядровмісних клітин була також істотно меншою, тоді як маса селезінки, навпаки, вищою.

Дослідження клітинного складу тимуса показало, що у мишей лінії FVB/N частка CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клітин перевищувала значення показника у мишей лінії 129/Sv, тоді як частка CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> і CD3<sup>+</sup>-клітин, навпаки, була меншою (табл. 2).

При вивченні клітинного складу селезінки встановлено, що частка CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>-клітин у мишей лінії FVB/N практично не відрізнялась від тієї, що була у мишей лінії 129/Sv ( $P > 0,05$ ).

У мишей лінії FVB/N кількість ядровмісних клітин, відносний і абсолютний вміст не тільки КУК-Ф, але й КУК-ГМ перевищував ( $P < 0,05$ ) значення показників у мишей лінії 129/Sv (табл. 3). Частка CD3<sup>+</sup>-клітин у кістковому мозку також була вищою ( $P < 0,05$ ). Хоча частка CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> і CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-клітин істотно не відрізнялась у мишей досліджуваних ліній, їх співвідношення може вказувати на

збагачення органа CD4<sup>+</sup>-клітинами у мишей лінії FVB/N.

Оцінка балансу Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку показала, що частка CD3<sup>+</sup> і CD11b<sup>+</sup>-клітин у мишей лінії FVB/N ( $4,5 \pm 0,2$  і  $0,65 \pm 0,1\%$  відповідно) була більшою ( $P < 0,05$ ), ніж у мишей лінії 129/Sv ( $2,85 \pm 0,2$  і  $0,3 \pm 0,1\%$  відповідно).

Слід відмітити, що вміст мелатоніну в периферичній крові мишей лінії FVB/N був меншим ( $32,1 \pm 6,5$  пмоль/л), ніж у мишей лінії 129/Sv ( $78,4 \pm 8,6$  пмоль/л,  $P < 0,05$ ). Маса надниркових залоз у мишей лінії FVB/N і 129/Sv істотно відрізнялась і становила  $4,7 \pm 0,6$  і  $3,2 \pm 0,2$  мг відповідно ( $P < 0,05$ ). Вміст тимуліну в супернатанті культивованої строми тимусів мишей лінії 129/Sv зменшувався після її інкубації з кортикостероном (з  $5,8 \pm 0,6$  до  $3,8 \pm 0,4 \log_2$ ;  $P < 0,05$ ) і практично не змінювався у мишей лінії FVB/N ( $5,2 \pm 0,6$  і  $4,9 \pm 0,1 \log_2$  відповідно;  $P > 0,05$ ).

Таким чином, у інтактних/інбредних мишей лінії FVB/N і 129/Sv із різним галлотипом H-2 відмінності у функціонуванні

**Таблиця 1.** Вміст у крові тимуліну, маса лімфоїдних органів і кількість у них ядровмісних клітин у мишей різних ліній (M ± m)

Показник	Миші лінії FVB/N	Миші лінії 129/Sv
Тимулін, $\log_2$ титру	4,0±0,4	5,5±0,2*
Маса тимуса, мг	14,6±1,7	19,7±1,9*
Тимусний індекс, мг/г · 10 <sup>-3</sup>	0,49±0,06	0,75±0,07*
Кількість клітин у тимусі, · 10 <sup>6</sup>	16,2±3,9	37,4±3,8*
Маса селезінки, мг	131,3±20,3	85,9±5,8*
Селезінковий індекс, мг/г · 10 <sup>-3</sup>	4,5±0,6	3,2±0,2*
Кількість клітин у селезінці, · 10 <sup>6</sup>	186,0±28,1	168,4±13,0

Примітка: тут і в табл. 2-3; \* $P < 0,05$  щодо значень у мишей лінії FVB/N.

**Таблиця 2.** Клітинний склад тимуса мишей різних ліній (M ± m)

Показник	Миші лінії FVB/N	Миші лінії 129/Sv
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	74,8±0,9	66,0± 5,4
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> , %	16,1±0,4	27,1±2,8*
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	4,6±0,4	2,4±0,58*
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> , %	4,5±0,1	4,5±0,1
CD3 <sup>+</sup> , %	19,0±1,8	32,1±2,4*

**Таблиця 3. Кількість колонісуювальних клітин-попередників для фібробластів і гранулоцитів-макрофагів (КУК-Ф, КУК-ГМ відповідно) і Т-лімфоцитів у кістковому мозку мишей різних ліній (M±m)**

Показник	Миші лінії FVB/N	Миші лінії 129/Sv
Кількість клітин у кістковому мозку, $\cdot 10^6$	20,4±1,5	15,2±2,0*
Кількість КУК-Ф/10 <sup>6</sup>	24,8±3,4	16,4±2,3*
Загальна кількість КУК-Ф в одному стегні	528,4±95,3	194,7±23,1*
Кількість КУК-ГМ/10 <sup>6</sup>	11,5±3,0	8,1±2,5
Загальна кількість КУК-ГМ в одному стегні	217,1±20,1	123,1±30,1*
CD3 <sup>+</sup> , %	5,2±0,2	4,5±0,2*
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> , %	2,1±0,2	1,9±0,2
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	2,1±0,2	2,4±0,2

імунної та ендокринної систем виявлялися на рівні не тільки периферичних, але й центральних органів (тимус, кістковий мозок, епіфіз). Спостерігалася також різниця в кількості Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку, а також особливості взаємодії тимуса і надниркових залоз.

*Функціональний стан імунної системи та надниркових залоз у мишей із різним га-*

*плотипом H-2 після введення нейротоксину.* Встановлено, що під впливом МФТП вміст у крові тимуліну істотно знижувався відносно контрольної групи тільки у мишей лінії 129/Sv (табл. 4). У мишей обох ліній значення показників стану тимуса зменшувалися, а селезінки залишалися практично без змін у мишей лінії FVB/N і були меншими, ніж у контролі у мишей лінії 129/Sv (див. табл. 1).

**Таблиця 4. Вплив МФТП на показники стану імунної системи та надниркової залози у мишей різних ліній (M ± m)**

Показник	Миші лінії FVB/N		Миші лінії 129/Sv	
	Контроль	МФТП	Контроль	МФТП
Тимулін, log <sub>2</sub> титру	3,7±0,4	3,2±0,3	4,9±0,4 <sup>#</sup>	3,1±0,3*
Маса тимуса, мг	13,2±0,5	10,9±0,4*	15,2±0,9	12,2±0,7*
Тимусний індекс, мг/г $\cdot 10^{-3}$	0,41±0,02	0,3±0,01*	0,59±0,08	0,35±0,03*
Кількість клітин у тимусі, $\cdot 10^6$	16,2±1,3	12,8±1,1*	29,5±2,1 <sup>#</sup>	13,2±1,2*
Маса селезінки, мг	139,2±11,0	149,1±8,0	97,3±6,4 <sup>#</sup>	72,1±5,8 <sup>#</sup>
Селезінковий індекс, мг/г $\cdot 10^{-3}$	4,8±0,4	4,9±0,5	3,9±0,4	2,2±0,2 <sup>#</sup>
Кількість клітин у селезінці, $\cdot 10^6$	189,0±27,0	192,2±17,8	175,2±15,0	136,0±8,4
Маса надниркової залози, мг	3,3±0,3	4,3±0,4*	3,0±0,3	2,5±0,3 <sup>#</sup>

Примітка: \*P < 0,05 порівняно з групою контролю; <sup>#</sup>P < 0,05 порівняно з мишами лінії FVB/N.

Після введення МФТП маса надниркової залози збільшувалася тільки у мишей лінії FVB/N (див. табл. 4).

При дослідженні впливу нейротоксину МФТП на вміст клітин імунної системи у головному мозку встановлено, що частка CD3<sup>+</sup>-клітин зростала у дослідних мишей лінії FVB/N (з  $4,5 \pm 0,2$  до  $5,6 \pm 0,3\%$ ,  $P < 0,05$ ), тоді як CD11b<sup>+</sup>-клітин – у мишей лінії 129/Sv (з  $0,3 \pm 0,02$  до  $0,95 \pm 0,08\%$ ,  $P < 0,05$ ). При цьому частка CD3<sup>+</sup>-клітин у головному мозку контрольних і дослідних мишей лінії 129/Sv була  $2,8 \pm 0,2$  і  $2,5 \pm 0,2\%$  відповідно,  $P > 0,05$ , CD11b<sup>+</sup>-клітин у мишей лінії FVB/N –  $0,65 \pm 0,1$  і  $0,7 \pm 0,1\%$  ( $P > 0,05$ ).

Таким чином, наявність і напрямок змін значень показників стану імунної системи, надниркових залоз, кількості Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку мишей після введення нейротоксину МФТП значною мірою залежали від їх гаплотипу.

*Вплив гаплотипу H-2 на стан імунної та нейроендокринної систем у інтактних мишей.* Нами встановлено, що у мишей лінії FVB/N і 129/Sv є відмінності в клітинному складі тимуса та його ендокринній функції. Зокрема, частка CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>-тимоцитів і вміст тимуліну в крові мишей лінії 129/Sv були вищими, ніж у тварин лінії FVB/N. Відомо, що CD4<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-клітини є регуляторними, а CD3<sup>+</sup>-клітини формують комплекс з Т-клітинним рецептором, що потрібно для взаємодії лімфоцитів і антигенпрезентуючої клітини [13]. Є дані щодо впливу тимуліну на утворення в тимусі CD3<sup>+</sup> – і регуляторних Т-клітин, а також мутації генів Т-клітинного рецептора у мишей лінії FVB/N [14, 15]. Тому не виключено, що відмінності клітинного складу тимуса у мишей лінії FVB/N і 129/Sv частково могли бути пов'язані з особливостями стану тимічної ендокринної функції. Так само нижчий вміст тимуліну в крові мишей лінії FVB/N можна пояснити меншою активністю епіфіза. Зокрема, показано стимулювальний вплив мелатоніну на утворення в тимусі тимуліну та його секрецію в циркуляцію [15].

Згідно з нашими результатами, в кістковому мозку мишей лінії FVB/N кількість КУК-Ф, КУК-ГМ і CD3<sup>+</sup>-клітин була вищою, ніж у мишей лінії 129/Sv (збагачення органа CD4<sup>+</sup>-клітинами). Відомо, що в кістковому мозку стромальні фібробласти, Т-клітини (зокрема, Т-хелпери), макрофаги і В-лімфоцити виконують функцію клітин мікрооточення для гемопоетичних стовбурових клітин [16]. При цьому стромальні фібробласти і Т-лімфоцити продукують цілий спектр гемопоетичних цитокінів, які впливають на диференціювання гемопоетичних попередників у гранулоцитарно-макрофагальному напрямку. Мабуть, тому у мишей лінії FVB/N на тлі більшої кількості КУК-Ф і Т-клітин у кістковому мозку нами виявлено більшу кількість КУК-ГМ порівняно зі значеннями у мишей лінії 129/Sv.

Відмінності у функціонуванні тимуса і кісткового мозку мишей лінії FVB/N і 129/Sv можуть сприяти формуванню у них особливостей балансу Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку. Дослідниками показана можливість міграції Т-лімфоцитів і моноцитів із циркуляції в головний мозок за нормальних умов та посилення цього процесу при ушкодженні гематоенцефалічного бар'єра [17]. Не виключено, що у інтактних мишей лінії FVB/N міграція Т-лімфоцитів із периферії в головний мозок активніша, ніж у мишей лінії 129/Sv, на що вказує лінійна різниця між кількістю цих клітин у головному мозку і тимусі на тлі її відсутності в селезінці. Більша кількість CD11b<sup>+</sup>-клітин у головному мозку мишей лінії FVB/N найпевніше пов'язана з більшим вмістом гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у кістковому мозку із подальшим утворенням циркулюючих моноцитів та їх перетворення на макрофаги після інфільтрації головного мозку.

*Вплив нейротоксину на стан імунної та ендокринної систем у мишей із різним гаплотипом H-2.* В своїй роботі ми використали нейротоксин МФТП, який ушкоджує не тільки ЦНС, але й органи імунної та ендокринної систем [4, 5, 18]. Встановлено,

що під впливом МФТП частка Т-лімфоцитів у головному мозку збільшувалась у мишей лінії FVB/N і залишалась без змін у мишей лінії 129/Sv. Лінійні відмінності кількості Т-клітин у головному мозку збігалися зі зниженням клітинності тимуса у мишей обох ліній, а також істотного зменшення клітинності селезінки і вмісту в крові тимуліну лише у мишей лінії 129/Sv. Із даних літератури відомо про інфільтрацію головного мозку Т-лімфоцитами (CD4<sup>+</sup>Т-хелпери), підвищення вмісту глюкокортикоїдів у крові та посилення перерозподілу лімфоцитів за умов дії ушкоджуючих/стресових чинників, до яких відноситься і МФТП [3, 4]. Тому в нашому дослідженні особливості змін стану імунної системи у мишей лінії FVB/N найпевніше є проявами перерозподілу лімфоцитів і посилення міграції Т-лімфоцитів із периферії в головний мозок, тоді як у мишей лінії 129/Sv – токсичного/ушкоджувального впливу МФТП. Факти відсутності зниження вмісту тимуліну в крові дослідних мишей лінії FVB/N на тлі підвищення маси надниркових залоз, а також результати наших дослідів *in vitro* з інкубацією стромы тимусів цих мишей з кортикостероном свідчать про порушення взаємодії тимуса і надниркових залоз.

Нами встановлено, що під впливом МФТП частка CD11b<sup>+</sup>-клітин (макрофаги) у головному мозку істотно зростала тільки у мишей лінії 129/Sv, що ймовірно пов'язано з лінійними особливостями реакції кісткового мозку на введення нейротоксину. Таке припущення ґрунтується на результатах щодо збігу змін вмісту макрофагів у головному мозку, КУК-ГМ у кістковому мозку і циркулюючих моноцитів у крові мишей цієї лінії після введення ушкоджуючого чинника (нейротоксину), на відміну від мишей лінії FVB/N [8, 12].

Виявлені відмінності балансу Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку мишей лінії FVB/N і 129/Sv, яким вводили МФТП, можуть бути асоційовані з особливостями морфофункціональних змін ЦНС. Так, нами раніше показані більш виражені під впли-

вом МФТП нейродегенеративні порушення структур головного мозку і темпи загибелі мишей лінії FVB/N, ніж мишей лінії 129/Sv [8]. Для різниці ушкоджувального впливу нейротоксину на ЦНС у таких мишей можуть мати значення особливості спектра прозапальних цитокінів, що продукують Т-лімфоцити і макрофаги [19] і більш виражений антиоксидантний захист головного мозку у мишей лінії 129/Sv [8]. Також є важливими виявлені нами відмінності ендокринної функції тимуса і мелатонінутворювальної функції епіфіза у мишей лінії FVB/N і 129/Sv на момент введення МФТП. Авторами показано інгібувальний вплив тимуліну на синтез прозапальних цитокінів у головному мозку, а також антизапальний, антиоксидантний і антиапоптотичний ефекти мелатоніну в ЦНС [15, 20–22].

## ВИСНОВКИ

Таким чином, у інтактних мишей лінії FVB/N і 129/Sv, які відрізняються за гаплотипом Н-2, показано відмінності у функціонуванні центральних (тимус, кістковий мозок, епіфіз) і периферичних (селезінка, надниркові залози) органів імунної та ендокринної систем, а також у кількості Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку. Крім того, у них є відмінності у взаємодії тимуса і надниркових залоз. У мишей лінії FVB/N і 129/Sv після введення нейротоксину МФТП виявлено особливості змін функціонування тимуса, селезінки і надниркових залоз, які можуть бути пов'язані з формуванням балансу Т-лімфоцитів і макрофагів у головному мозку і, як результат, морфофункціональних порушень ЦНС. Отримані результати поглиблюють наше уявлення щодо патогенезу ХП/паркінсонізму та надалі можуть бути підґрунтям для розробки індивідуалізованих методів медикаментозного лікування цієї патології.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were*

*not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**I.F. Labunets, A.E. Rodnichenko**

**THE STATE OF THE IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS IN MICE WITH DIFFERENT HAPLOTYPE H-2 AND ITS POTENTIAL CONNECTION WITH EXPERIMENTAL PARKINSONISM MANIFESTATIONS**

*Institute of Genetic and Regenerative Medicine, M.D. Strazhesko National Scientific Center of Cardiology, Clinical and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: irina\_labunets@ukr.net*

In male mice of the strains FVB/N (haplotype H-2q) and 129/Sv (haplotype H-2b) aged 6-7 months, estimated indicators of the functioning of the thymus, bone marrow, spleen, pineal gland and adrenal glands, the number of CD3<sup>+</sup> (T-lymphocytes) and CD11b<sup>+</sup> (macrophages) cells in the brain, and also studied the characteristics of changes in the values of indicators after administration of neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to such mice (reproduction of parkinsonism). We have found that in intact mice of the FVB/N strain the thymulin level in the blood and the mass and cellularity of the thymus are lower, and the number of CD3<sup>+</sup> cells, colony-forming progenitor cells for fibroblasts and granulocytes-macrophages in the bone marrow are greater than in mice of the 129/Sv strain. The number of CD3<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells in the brain of FVB/N strain mice exceeds their value in 129/Sv strain mice by 1.6 and 2.2 times, respectively. The level of melatonin in the blood of mice of the FVB/N strain was 2.4 times lower than in mice of the 129/Sv strain, while the mass of the adrenal glands was greater. The *in vitro* experiments have shown a decrease of the thymulin level in the supernatant of the cultured thymus stroma after incubation with corticosterone in mice of the 129/Sv strain (from  $5.8 \pm 0.6$  to  $3.8 \pm 0.4$ , log<sub>2</sub>) and no changes in the indicator in mice of the FVB/N strain. 18 days after MPTP administration there was a drop in the blood thymulin level, in the mass and cellularity of the spleen in mice of the 129/Sv strain, a decrease in the mass and cellularity of the thymus in mice of both strains, and an increase in the mass of the adrenal glands in mice of the FVB/N strain. Under the influence of the neurotoxin, the proportion of CD3<sup>+</sup> cells in the brain of mice of the FVB/N strain has significantly increased compared to the control group, while in the mice of the 129/Sv strain the proportion of CD11b<sup>+</sup> cells has increased significantly. Thus, the haplotype H-2 of mice has affected the functioning of the central and peripheral organs of the immune and endocrine

systems, the number of T-lymphocytes and macrophages in the brain as well as the manifestations of changes in indicators after MPTP administration, which may be important for the formation of feature of morphofunctional disorders in the nervous system in such animals.

Key words: experimental parkinsonism; neurotoxin MPTP; haplotype; thymus; thymulin; bone marrow; melatonin; the brain T-lymphocytes and macrophages.

**REFERENCES**

1. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics and pathophysiology. *Clin Geriatr.* 2020; 36(1):1-12.
2. Kannarkat GT, Cook DA, Lee JK, Chang J, Chung J, Sandy E, et al. Common genetic variant association with altered HLA expression synergy with pyrethroid exposure, and risk for Parkinson's disease: an observational and case control study. *NPJ Parkinsons Dis.* 2015;1:15002.
3. Appel H, Beers R, Henkel S. The T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends Immunol.* 2010;31(1):7-17.
4. Herrero M-T, Estrada C, Maatouk L, Vyas S. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. *Front Neuroanat.* 2015;9:32.
5. Zhang XS, Geng WSh, Jia JJ. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro.* 2018;10:1-15.
6. Fox GB, LeVasseur RA, Faden A. Behavioral responses of C57Bl/6 FVB/N, and 129/SvEMS mouse strains to traumatic brain injury: implications for gene targeting approaches to neurotrauma. *J Neurotrauma.* 1999;16(5):377-89.
7. Labunets IF. Behavioral features in the mice of various strains and sex with model of parkinsonism. *Fiziol Zh.* 2020;66(1):18-24. [Ukrainian].
8. Labunets I, Panteleymonova T, Kyrk V, Toporova O, Pikus P, Litoschenko Z. The effects of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells transplantation in mice of different strains with an experimental model of parkinsonism. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(2):96-103. [Ukrainian].
9. Friedenstein AJ, Chailakhian RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen colonies. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.
10. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cell *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966;44:287-99.
11. Bach JF, Bach MA, Blanot D. Thymic serum factor (FTS). *Bull Inst Pasteur.* 1978;76: 325-98.
12. Labunets I, Rodnichenko A, Savosko S, Pivneva T. Reaction of different cell types of the brain on neurotoxin cuprizone and hormone melatonin treatment in young and aging mice. *Front Cell Neurosci.* 2023; 17:1131130.
13. Boehm T, Bleul CC. Thymus homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol.* 2006;27(10):477-84.



14. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L. FVB/N (H-2(q)) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics*. 1999; 49(10):851-9.
15. Rezzani R, Franco C, Hardeland R, Rodella LF. Thymus-pineal gland axis: revisiting its role in human life and ageing. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8806.
16. Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone-marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, and B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev*. 2000;117:57-68.
17. Kamphuis W W, Derada T C, Reijkerker A, Romero I A, deVries HE. The blood-brain barrier in multiple sclerosis: microRNAs as key regulators. *CNS Neurol Disord Drug Target*. 2015;14:157-67.
18. Bieganska K, Czlonkowska A, Bidzinski A, Mierzewska H, Korlak J. Immunological changes in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J Neuroimmunol*. 1993;42(1):33-7.
19. Kim HAh, Whittle SC, Lee S, Chu HX, Zhang ShR, Wei Z, et al. Brain immune cell composition and functional outcome after cerebral ischemia: comparison of two mouse strains. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8. Article 365.
20. Cho JH, Bhutani S, Kim CH, Irwin MR. Anti-inflammatory effects of melatonin: a systematic review and meta-analysis of clinical trial. *Brain Behav Immunol*. 2021;93:245-53.
21. Reggiani PC, Schwerdt JI, Console GM, Roggero EA, Dardenne M, Goya RG. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Curr Pharm Des*. 2014;20:4690-6.
22. Chen D, Zhang T, Lee TH. Cellular mechanisms of melatonin: insight from neurodegenerative diseases. *Biomolecules*. 2020; 10.1158.

*Матеріал надійшов  
до редакції 14.02.2024*